

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-274982

(P2003-274982A)

(43) 公開日 平成15年9月30日 (2003.9.30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 45/00	2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 P 11/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 11/00		11/06	4 B 0 6 3
11/06		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 4
C 0 7 K 14/47		16/18	4 B 0 6 5
審査請求 未請求 請求項の数34 O L (全 43 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2002-319395(P2002-319395)	(71) 出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22) 出願日	平成14年11月1日(2002.11.1)	(72) 発明者	中西 淳 茨城県つくば市花室1557-11
(31) 優先権主張番号	特願2001-337864(P2001-337864)	(72) 発明者	森田 滋 カナダ国 ケー1エヌ 8ビー5、オンタ リオ州、オタワ、チャペル ストリート 160、アパート 1103
(32) 優先日	平成13年11月2日(2001.11.2)	(74) 代理人	100092783 弁理士 小林 浩 (外3名)
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願2001-380099(P2001-380099)		
(32) 優先日	平成13年12月13日(2001.12.13)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
(31) 優先権主張番号	特願2002-10035(P2002-10035)		
(32) 優先日	平成14年1月18日(2002.1.18)		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新規タンパク質、そのDNAおよびその用途

(57) 【要約】

【課題】 肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患の予防・治療に有用な、新規タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、該タンパク質の活性を阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物などの提供。

【解決手段】 本発明のタンパク質およびポリヌクレオチドは、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患、鼻炎などの診断マーカー等として有用であり、該タンパク質またはポリヌクレオチドを用いるスクリーニングにより得られる阻害剤、該タンパク質の活性を阻害する中和抗体は、例えば、慢性閉塞性肺疾患などの肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患、鼻炎などの予防・治療剤として使用することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

【請求項 2】 配列番号：1 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 3】 配列番号：22 で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩。

【請求項 4】 配列番号：22 で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩。

【請求項 5】 請求項 1 または請求項 3 記載のタンパク質の部分ペプチドまたはそれらの塩。

【請求項 6】 請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質または請求項 5 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

【請求項 7】 DNA である請求項 6 記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8】 配列番号：2 で表される塩基配列からなる DNA。

【請求項 9】 配列番号：23 で表される塩基配列からなる DNA。

【請求項 10】 請求項 7 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項 11】 請求項 10 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項 12】 請求項 11 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を生成、蓄積せしめ、これを採用することを特徴とする請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の製造法。

【請求項 13】 請求項 7 記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬。

【請求項 14】 請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体。

【請求項 15】 請求項 14 記載の抗体を含有してなる医薬。

【請求項 16】 請求項 14 記載の抗体を含有してなる診断薬。

【請求項 17】 請求項 7 記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド。

【請求項 18】 請求項 17 記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬。

【請求項 19】 請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペ

プチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 20】 請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 21】 請求項 19 記載のスクリーニング方法または請求項 20 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩。

【請求項 22】 請求項 21 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 23】 請求項 6 記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 24】 さらにサイトカインを用いる請求項 23 記載のスクリーニング方法。

【請求項 25】 サイトカインが IL-13 である請求項 24 記載のスクリーニング方法。

【請求項 26】 請求項 6 記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項 27】 (i) 請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドを産生する能力を有する細胞をサイトカイン存在下培養した場合と (ii) 上記細胞と試験化合物との混合物をサイトカイン存在下培養した場合の請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質もしくは請求項 5 記載の部分ペプチドの遺伝子の発現量を測定し、比較することを特徴とする、請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項 28】 請求項 23 もしくは請求項 27 記載のスクリーニング方法または請求項 26 記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、請求項 1 もしくは請求項 3 記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩。

【請求項 29】 請求項 28 記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 30】 慢性閉塞性肺疾患または気管支喘息の予防・治療剤である請求項 15、18、22 または 29 記載の医薬。

【請求項 31】 慢性閉塞性肺疾患または気管支喘息の診断薬である請求項 13 または 16 記載の診断薬。

【請求項 32】 哺乳動物に対し、請求項 21 または請

請求項28記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする慢性閉塞性肺疾患または気管支喘息の予防・治療方法。

【請求項33】 慢性閉塞性肺疾患または気管支喘息の予防・治療剤を製造するための、請求項21または請求項28記載の化合物またはその塩の使用。

【請求項34】 請求項1もしくは請求項3記載のタンパク質もしくは請求項5記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる肺・胸部疾患の予防・治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規タンパク質、該タンパク質をコードするDNA、該タンパク質の活性を阻害する化合物のスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られる化合物等に関する。さらに詳しくは、慢性閉塞性肺疾患の予防・治療剤または診断剤として有用な新規タンパク質等に関する。

【0002】

【従来の技術】慢性閉塞性肺疾患（慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息等）は、喫煙世代の高齢化、平均寿命の延長等にもなっており、今後、呼吸器疾患の中心的な病気になると考えられている。また、気管支喘息は気道の慢性炎症性疾患であり、気道狭窄を示し、発作性の呼吸困難、喘鳴、咳などの症状が見られる。その発症と進展には気道上皮細胞、肥満細胞、好酸球、Tリンパ球などの多くの細胞が関与している。気管支喘息の最も重要な特徴の1つは、気道が刺激に対して反応しやすいこと（気道過敏性）である。この気道過敏性は、好酸球など気道に浸潤した細胞から分泌される化学伝達物質による気道上皮の剥離を中心とする気道の炎症に起因するが、さらに、遺伝因子や環境因子も複雑に影響していると考えられている。外界からの刺激

（アレルゲン、排気物）やウイルス感染により気道の炎症反応の引き金がかかると、気道上皮細胞や気管支周囲の毛細血管内皮細胞上にVCAM-1やICAM-1などの接着分子が発現し〔ジャーナル・オブ・アラジー・アンド・クリニカル・イムノロジー（J.Allergy Clin.Immunol.）、96巻、941頁（1995）〕、サイトカインや化学遊走物質が産生される。気管支喘息の患者はTh2型のヘルパーT細胞の機能が亢進しており、IL-3、IL-4、IL-5、IL-13、GM-CSFなどのTh2型のサイトカインやeotaxin、RANTESなどのケモカインの産生が増加する。IL-4やIL-13はIgEの産生誘導作用があり、IL-3やIL-4は肥満細胞の増殖誘導作用がある。さらに、IL-5、GM-CSFなどの作用により好酸球が分化増殖し、eotaxin、RANTESにより気道に浸潤してくる〔アラジー・アンド・アズマ・プロシーディング（Allergy Asthma Proc.）、20巻、141頁（1999）〕。また、サイトカインの中でも、特にIL-13が慢性閉塞性肺疾患の発症や気管支喘息における粘

液過分泌の重要な因子であることが報告されてきている〔ジャーナル オブ クリニカル インヴェスティゲーション（J. Clin. Invest.）、106巻、1081頁（2000）；ジャーナル オブ クリニカル インヴェスティゲーション（J. Clin. Invest.）、103巻、779頁（1999）、〕。ヒトCLCA1遺伝子の塩基配列は、ジェノミクス（Genomics）、54巻、200頁（1998）、バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーションズ（Biochem Biophys Res Commun）、255巻、347頁（1999）などに記載されており、この遺伝子が気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患と関連していることが報告されている（特許文献1 WO 01/38530号公報）。ヒトCLCA1遺伝子の塩基配列と相同性を示すものとして、マウスgob-5遺伝子の塩基配列〔バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチコミュニケーション（Biochem. Biophys. Res. Commun.）、255巻、347頁（1999）〕、ブタCLCA1遺伝子の塩基配列〔フィジオリジカル ゲノミクス（Physiol.Genomics）、3巻、101頁（2000）〕などが知られている。

【特許文献1】WO 01/38530号公報

【0003】

【発明が解決しようとする課題】副作用の少ない優れた慢性閉塞性肺疾患および気管支喘息の予防・治療剤および診断剤の開発が望まれている。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、IL-13により発現が誘導されるcDNAを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、（1）配列番号：1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、（2）配列番号：1で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、（3）配列番号：22で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩、

（4）配列番号：22で表されるアミノ酸配列からなるタンパク質またはその塩、（5）上記（1）または上記（3）記載のタンパク質の部分ペプチドまたはそれらの塩、（6）上記（1）もしくは上記（3）記載のタンパク質または上記（5）記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

（7）DNAである上記（6）記載のポリヌクレオチド、（8）配列番号：2で表される塩基配列からなるDNA、（9）配列番号：23で表される塩基配列からなるDNA、（10）上記（7）記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、（11）上記（10）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、（12）上記（11）記載の形質転換体を培養し、上記（1）もしくは上記（3）記載のタンパク質も

しくは上記(5)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を生成、蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の製造法、(13) 上記(7)記載のポリヌクレオチドを含有してなる診断薬、(14) 上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、(15) 上記(14)記載の抗体を含有してなる医薬、(16)

上記(14)記載の抗体を含有してなる診断薬、(17) 上記(7)記載のポリヌクレオチドの塩基配列に相補的もしくは実質的に相補的な塩基配列またはその一部を含有するアンチセンスポリヌクレオチド、(18)

上記(17)記載のアンチセンスポリヌクレオチドを含有してなる医薬、(19) 上記(1)もしくは上記

(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を用いることを特徴とする、上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(20) 上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩を含有することを特徴とする、上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(21) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(20)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩、(22) 上記(21)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、(23) 上記(6)記載のポリヌクレオチドを用いることを特徴とする、上記(1)もしくは上記

(3)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(24) さらにサイトカインを用いる上記(23)記載のスクリーニング方法、(25) サイトカインがIL-13である上記(24)記載のスクリーニング方法、(26) 上記(6)記載のポリヌクレオチドを含有することを特徴とする、上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(27) (i) 上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドを産生する能力を有する細胞をサイトカイン存在下培養した場合と(ii) 上記細胞と試験化合物との混合物をサイトカイン存在下培養した場合の上記

(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドの遺伝子の発現量を測定し、比較することを特徴とする、上記(1)もしくは上

記(3)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(28) 上記(23)もしくは上記(27)記載のスクリーニング方法または上記(26)記載のスクリーニング用キットを用いて得られうる、上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩、(29) 上記(28)記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、(30) 慢性閉塞性肺疾患または気管支喘息の予防・治療剤である上記(15)、(18)、(22)または(29)記載の医薬、(31)

慢性閉塞性肺疾患または気管支喘息の診断薬である上記(13)または(16)記載の診断薬、(32) 哺乳動物に対し、上記(21)または(28)記載の化合物またはその塩の有効量を投与することを特徴とする慢性閉塞性肺疾患または気管支喘息の予防・治療方法、(33) 慢性閉塞性肺疾患または気管支喘息の予防・治療剤を製造するための、上記(21)または(28)記載の化合物またはその塩の使用、(34) 上記(1)もしくは上記(3)記載のタンパク質もしくは上記(5)記載の部分ペプチドまたはそれらの塩の活性を阻害する化合物またはその塩を含有してなる肺・胸部疾患の予防・治療剤などを提供する。さらには、(35) タンパク質が、①配列番号：1で表されるアミノ酸配列、②配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、③配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、④配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、⑤配列番号：1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑥これら②~⑤を組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質である上記

(1)記載のタンパク質、(36) タンパク質が、①配列番号：22で表されるアミノ酸配列、②配列番号：22で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、③配列番号：22で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、④配列番号：22で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~1

0個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、⑤配列番号:22で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑥これら②~⑤を組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質である上記(3)記載のタンパク質、(37) 上記(6)記載のポリヌクレオチドとハイスロジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドなども提供する。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明の配列番号:1で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質および配列番号:22で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質(以下、これらを本発明のタンパク質と称することもある)は、ヒトや非ヒト温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、杯細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睪丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋などに由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

【0006】配列番号:1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号:1で表わされるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、さらに好ましくは約97%以上、より好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。配列番号:1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号:1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号:1で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。配列番号:22で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号:22で表わされるアミ

ノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、さらに好ましくは約97%以上、より好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。配列番号:22で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号:22で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号:22で表されるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。実質的に同質の活性としては、例えば、クロライドチャネル様活性(カルシウム依存性クロライドチャネル様活性)などが挙げられる。実質的に同質とは、それらの性質が性質的に(例、生理学的に、または薬理的に)同質であることを示す。したがって、クロライドチャネル様活性が同等(例、約0.01~100倍、好ましくは約0.1~10倍、より好ましくは0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。クロライドチャネル様活性などの活性の測定は、公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、ジェノミクス(Genomics)、54巻、200頁(1998)に記載の方法またはそれに準じる方法に従って測定することができる。

【0007】また、本発明のタンパク質としては、例えば、(1)①配列番号:1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号:1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号:1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号:1で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテイン、(2)①配列番号:22で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号:22で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号:22で表されるアミノ酸配列に1または2個以上(好ましくは、1~30個程度、好ましくは1~10個程度、さらに好ましくは数(1~5)個)のアミノ酸が挿入さ

れたアミノ酸配列、④配列番号：22で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインなども含まれる。

【0008】本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。配列番号：1または配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、C末端が、カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチルなどのC₁₋₆アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC₃₋₈シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどのC₆₋₁₂アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル-C₁₋₂アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル-C₁₋₂アルキル基などのC₇₋₁₄アラルキル基、ビバロイルオキシメチル基などが用いられる。本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイルなどのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC₁₋₆アルカノイル基などのC₁₋₆アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質、配列番号：22で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質などがあげられる。

【0009】本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、前記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、前記した本発明のタンパク質と同様の性質を有するものであればいずれのものでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列のうち少なくとも20個以上、好ましくは50個以上、さらに好ま

しくは70個以上、より好ましくは100個以上、最も好ましくは200個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが用いられる。

【0010】また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数（1～5）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。また、本発明の部分ペプチドはC末端がカルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）、カルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）、アミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）の何れであってもよい。さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のタンパク質と同様に、C末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有しているものの、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原としても用いることができる。本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸

（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0011】本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩は、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや非ヒト哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせ

せることにより精製単離することができる。

【0012】本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、またはそのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2', 4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質または部分ペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOObt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

【0013】保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用することが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十

分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

【0014】原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、t-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化(例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化)、アラキルエステル化(例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、t-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級(C₁₋₆)アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、t-ブチル基などである。チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0015】原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(例えば、ペンタクロロフェノール、2, 4, 5-トリクロロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt)とのエステル]などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。保護基の除去(脱離)方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンス

ルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約 -20°C ～ 40°C の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1, 4-ブタンジチオール、1, 2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2, 4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1, 2-エタンジチオール、1, 4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

【0016】原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。タンパク質または部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質または部分ペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質または部分ペプチドとを製造し、これらのタンパク質またはペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質またはペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質またはペプチドを得ることができる。この粗タンパク質またはペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質またはペプチドのアミド体を得ることができる。タンパク質またはペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質またはペプチドのアミド体と同様にして、所望のタンパク質またはペプチドのエステル体を得ることができる。

【0017】本発明の部分ペプチドまたはそれらの塩は、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合さ

せ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下のi)～v)に記載された方法が挙げられる。

i) M. Bodanszky および M.A. Ondetti, ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

ii) SchroederおよびLuebke, ザ・ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

10 iii) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

iv) 矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

v) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

【0018】本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記した本発明のタンパク質をコードする塩基配列 (DNAまたはRNA、好ましくはDNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (すなわち、コード鎖) であっても、アンチセンス鎖 (すなわち、非コード鎖) であってもよい。本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15 (7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のタンパク質のmRNAを定量することができる。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、前述した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織より全RNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以

下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、例えば、(1)配列番号:2で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号:2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNA、

(2)配列番号:23で表される塩基配列を含有するDNA、または配列番号:23で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の性質を有するタンパク質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。配列番号:2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号:2で表される塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。配列番号:23で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号:23で表される塩基配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約97%以上、特に好ましくは約99%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0019】ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行うことができる。ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40mM、好ましくは約19~20mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

【0020】より具体的には、配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号:2で表される塩基配列を含有するDNAなどが、配列番号:22で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質をコードするDNAとしては、配列番号:23で表される塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。本発明の部分ペプチドをコードするDN

Aとしては、例えば、(1)配列番号:2で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号:2で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号:1で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNA、(2)配列番号:23で表される塩基配列を有するDNAの一部分を有するDNA、または配列番号:23で表される塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を含有し、配列番号:22で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするDNAの一部分を含有するDNAなどが用いられる。配列番号:2で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。配列番号:23で表される塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。本発明のタンパク質、部分ペプチド(以下、これらをコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質をコードする塩基配列の一部分を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行うことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行うことができる。

【0021】DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mutan™-superExpress Km(宝酒造(株))、Mutan™-K(宝酒造(株))等を用いて、ODA-LAPCR法やGapped duplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行うことができる。クローン化されたタンパク質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

【0022】本発明のタンパク質の発現ベクターは、例

えば、(イ) 本発明のタンパク質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pCDNA1/Neoなどが用いられる。

【0023】本発明のプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SRαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λP_Lプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン

(以下、SV40oriと略称する場合がある)などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素(以下、dhfrと略称する場合がある)遺伝子〔メソトレキセート(MTX)耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子(以下、Amp^rと略称する場合がある)、ネオマイシン耐性遺伝子(以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性)等が挙げられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンが含まれない培地によっても選択できる。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MFα・シグナル配

列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

【0024】このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*) K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)〕, JM103

〔ヌクレック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acid Research), 9巻, 309(1981)〕, JA221

〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)〕, HB101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)〕, C600〔ジェネティクス(Genetics), 39巻, 440(1954)〕などが用いられる。バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス(*Bacillus subtilis*) M1114〔ジーン, 24巻, 255(1983)〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)〕などが用いられる。酵母としては、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁺, NA87-11

A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス・ボンベ(*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*) KM71などが用いられる。昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、ヨトウガの幼虫由来株化細胞(*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh FiveTM細胞、Mamestrabraccae由来の細胞またはEstigmena acrae由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合

は、カイコ由来株化細胞(*Bombyx mori* N細胞; BmN細胞)などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞(ATCC CRL1711)、Sf21細胞(以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ(In Vivo), 13, 213-217, (1977))などが用いられる。昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー(Nature), 315巻, 592(1985)〕。動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO細胞と略記)、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(以下、CHO(dhfr⁻)細胞と略

10

20

30

40

50

記), マウスL細胞, マウスA t T-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

【0025】エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110 (1972)やジーン (Gene), 17巻, 107 (1982)などに記載の方法に従って行うことができる。バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111 (1979)などに記載の方法に従って行うことができる。酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929 (1978)などに記載の方法に従って行うことができる。昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオテクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55 (1988)などに記載の方法に従って行うことができる。動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456 (1973)に記載の方法に従って行うことができる。このようにして、タンパク質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

【0026】宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンステープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティクス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるため、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤

を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃~35℃で約24~72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [サイエンス (Science), 122巻, 501 (1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396 (1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519 (1967)], 199培地 [プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディシン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1 (1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

【0027】上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行うことができる。本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩

衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのタンパク質変性剤や、トリトンX-100™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行うことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。このようにして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当なタンパク修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。タンパク修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

【0028】このようにして生成する本発明のタンパク質の存在は、特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイやウエスタンブロッティングなどにより測定することができる。本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらを単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することが

【0029】〔モノクローナル抗体の作製〕

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモツ

ト、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリが挙げられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行うことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髄腫細胞が挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80％程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行うことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20％、好ましくは10～20％の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10％の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、水沢製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養

は、通常 5% 炭酸ガス下で行うことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0030】(b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行うことができる。

【0031】〔ポリクローナル抗体の作製〕本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン 1 に対し、約 0.1～20、好ましくは約 1～5 の割合でカプルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約 2～6 週毎に 1 回ずつ、計約 3～10 回程度行なわれる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

【0032】本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードする DNA（以下、アンチセンスポリヌクレオチドの説明においては、これらの DNA を本発明の DNA と略記する場合がある）の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有するアン

チセンスポリヌクレオチドとしては、本発明の DNA の塩基配列に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列またはその一部を有し、該 DNA の発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスポリヌクレオチドであってもよいが、アンチセンス DNA が好ましい。本発明の DNA に実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明の DNA に相補的な塩基配列（すなわち、本発明の DNA の相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有する塩基配列などが挙げられる。特に、本発明の DNA の相補鎖の全塩基配列うち、本発明のタンパク質の N 末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約 70% 以上、好ましくは約 80% 以上、より好ましくは約 90% 以上、最も好ましくは約 95% 以上の相同性を有するアンチセンスポリヌクレオチドが好適である。具体的には、配列番号：2 または配列番号：23 で表わされる塩基配列を有する DNA の塩基配列に相補的な、もしくは実質的に相補的な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド、好ましくは例えば、配列番号：2 または配列番号：23 で表わされる塩基配列を有する DNA の塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド（より好ましくは、配列番号：2 または配列番号：23 で表わされる塩基配列を有する DNA の塩基配列に相補な塩基配列、またはその一部分を有するアンチセンスポリヌクレオチド）などが挙げられる。

【0033】アンチセンスポリヌクレオチドは通常、10～40 個程度、好ましくは 15～30 個程度の塩基から構成される。ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンス DNA を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）は、例えば、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換されていてもよい。これらのアンチセンスポリヌクレオチドは、公知の DNA 合成装置などを用いて製造することができる。本発明に従えば、本発明のタンパク質遺伝子の複製または発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化した、あるいは決定されたタンパク質をコードする DNA の塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。かかるポリヌクレオチド（核酸）は、本発明のタンパク質遺伝子の RNA とハイブリダイズすることができ、該 RNA の合成または機能を阻害することができるか、あるいは本発明のタンパク質関連 RNA との相互作用を介して本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御することができる。本発明のタンパク質関連 RNA の選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、および本発明のタンパク質関連 RNA と特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオ

チドは、生体内および生体外で本発明のタンパク質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療または診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列または核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列または核酸とペプチド（タンパク質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列またはその相補体から誘導される指令にあるペプチド（タンパク質）のアミノ酸を通常指している。タンパク質遺伝子の5'端ヘアピンループ、5'端6-ベースペア・リピート、5'端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、タンパク質コード領域、ORF翻訳終止コドン、3'端非翻訳領域、3'端パリンドローム領域、および3'端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、タンパク質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

【0034】目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係については、目的核酸が対象領域とハイブリダイズすることができる場合は、その目的核酸は、当該対象領域のポリヌクレオチドに対して「アンチセンス」であるということができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリヌクレオチド、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のタンパク質核酸および合成配列特異的な核酸ポリマー）または特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（または非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホチオエート、ホスホロチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、ソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属な

ど）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」および「核酸」とは、プリンおよびピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリンおよびピリミジン、アシル化されたプリンおよびピリミジン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオチドおよび修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば、1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

【0035】本発明のアンチセンスポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、あるいは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リボソーム、ミクロソームのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピド、コレステロールなど）といった疎水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3'端あるいは5'端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3'端あるいは5'端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコール

をはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明のタンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸は、公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0036】以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質と略記する場合がある）、本発明のタンパク質または部分ペプチドをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）、および本発明のDNAのアンチセンスポリヌクレオチド（以下、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドと略記する場合がある）の用途を説明する。本発明のタンパク質は、慢性閉塞性肺疾患や鼻炎において組織特異的に発現が増加するので、疾患マーカーとして利用することができる。すなわち、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などにおける早期診断、症状の重症度の判定、疾患進行の予測のためのマーカーとして有用である。本発明のタンパク質をコードする遺伝子（本発明のタンパク質遺伝子）のアンチセンスポリヌクレオチド、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物もしくはその塩、本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物もしくはその塩、または本発明のタンパク質に対する抗体を含有する医薬は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの予防・治療剤として使用することができる。

【0037】〔1〕疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質および本発明のタンパク質遺伝子は、慢性閉塞性肺疾患や鼻炎において組織特異的に発現が増加し、肺、気道あるいは鼻粘膜における粘液産生促進作用および肺胞壁破壊促進作用を有するので、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、および本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物

またはその塩は、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの予防・治療剤などの医薬として使用できる。したがって、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用であり、該タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。すなわち、本発明は、（1）本発明のタンパク質を用いることを特徴とする本発明のタンパク質の活性（例えば、クロライドチャンネル活性など）を阻害する化合物またはその塩（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法、（2）本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いることを特徴とする本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩（以下、阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法を提供する。上記（1）および（2）の方法において、さらにサイトカインを用いてスクリーニングを行ってもよい。

【0038】スクリーニング方法の具体例としては、

(i) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をカルシウム賦活剤で活性化した場合と(ii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物とをカルシウム賦活剤で活性化した場合との比較を行うことを特徴とする阻害剤のスクリーニング方法が挙げられる。上記スクリーニング方法においては、例えば、(i) と (ii) の場合における、本発明のタンパク質のクロライドチャンネル活性を測定して、比較する。カルシウム賦活剤は、試験化合物と混合した後に、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に添加してもよく、また、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞にカルシウム賦活剤を添加した後、試験化合物を添加してもよい。本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物との混合は、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をカルシウム賦活剤で活性化する前または後の何れであってもよく、また本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に試験化合物とカルシウム賦活剤の混合物を添加してもよい。カルシウム賦活剤としてはイオノマイシン、A23187（カルシマイシン）などが用いられる。本発明のタンパク質のクロライドチャンネル活性は、公知の方法、例えば、ジェノミクス（Genomics）、54巻、200頁（1998）に記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って測定することができる。

【0039】スクリーニング方法の具体例としては、
(iii) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をサイトカイン存在下培養した場合と (iv) 本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物の混合物とをサイトカイン存在下培養した場合との比較を行うことを特徴とする阻害剤のスクリーニング方法も挙げられる。サイトカインとしては、例えば、IL-13、IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-9、TNF- α 、TGF- α 、EGF、bFGFなどが挙げられる。好ましくはIL-13が挙げられる。上記スクリーニング方法においては、例えば、(iii) と (iv) の場合における、本発明のタンパク質遺伝子の発現量（具体的には、本発明のタンパク質量または前記タンパク質をコードするmRNA量）を測定して、比較する。本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞と試験化合物との混合は、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞にサイトカインを接触させる前または後の何れであってもよく、また本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞に試験化合物とサイトカインの混合物を添加してもよい。本発明のタンパク質量の測定は、公知の方法、例えば、本発明のタンパク質を認識する抗体を用いて、細胞抽出液中などに存在する前記タンパク質を、ウェスタン解析、ELISA法などの方法またはそれに準じる方法に従い測定することができる。本発明のタンパク質遺伝子発現量は、公知の方法、例えば、ノーザンブロッティングやReverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)、リアルタイムPCR解析システム（ABI社製、TaqMan polymerase chain reaction）などの方法あるいはそれに準じる方法にしたがって測定することができる。
【0040】試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞をスクリーニングに適したバッファーに浮遊して調製する。バッファーには、pH約4~10（望ましくは、pH約6~8）のリン酸バッファー、ほう酸バッファーなどの、本発明のタンパク質のクロライドチャンネル活性を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。本発明のタンパク質を産生する能力を有する細胞としては、例えば、前述した本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターで形質転換された宿主（形質転換体）が用いられる。宿主としては、例えば、CHO細胞などの動物細胞が好ましく用いられる。該スクリーニングには、例えば、前述の方法で培養することによって、本発明のタンパク質を細胞膜上に発現させた形質転換体が好ましく用いられる。例えば、上記 (ii) の場合におけるクロライドチャンネル活性を、上記

(i) の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。例えば、上記 (iv) の場合における本発明のタンパク質遺伝子の発現量を、上記 (iii) の場合に比べて、約20%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは約50%以上阻害する試験化合物を本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩として選択することができる。

【0041】本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドをコードするポリペプチド、または本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドを産生する能力を有する細胞を含有するものである。本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物またはその塩であり、本発明のタンパク質の活性（例、クロライドチャンネル活性など）または本発明のタンパク質遺伝子の発現を阻害する化合物またはその塩である。該化合物の塩としては、前記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

【0042】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患（例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など）、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などに対する予防・治療剤などの医薬として有用である。本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、それ自体または適当な医薬として、安全に投与することができる。上記投与に用いられる医薬は、上記化合物またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものであり、経口または非経口投与に適する医薬組成物として提供される。例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。非経

口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水溶性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール

(例、エタノール)、ポリアルコール(例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール)、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 80、HCO-50 (polyoxyethylene (50mol) adduct of hydrogenated castor oil)〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

【0043】上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤(アンプル)、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常 5~500mg、とりわけ注射剤では 5~100mg、その他の剤形では 10~250mg の上記抗体が含有されていることが好ましい。例えば、経鼻投与のための組成物としては、吸入剤、点鼻剤、エアゾール剤などが用いられる。常套手段に従って得られた製剤を、吸入剤として使用する場合は、公知の方法を用いて、粉末吸入剤、吸入用懸濁剤、吸入用溶液またはカプセル状吸入剤とし、用時適当な吸入器を用いて適用することができ、特に粉末吸入剤が好ましく用いられる。粉末吸入剤の平均粒子径としては、特に限定されないが、約 0.1~約 20 μ m が好ましく、特に約 1~約 5 μ m が好ましい。また、粉末吸入剤の粒度としては、特に限定されないが、約 25 μ m 以上の粒子の量が約 5% 以下、特に約 1% 以下であることが好ましい。また、吸入剤を使用する場合、適用の際に使用する器具としては、市販の吸入器を用いても良く、例えば、ベントリン・ロタキャップス (VENTOLIN ROTACAPS; グラクソ社)、スピンヘラー (登録商標、藤沢薬品工業(株))、インタール・スピ

ンスファレーター (MIAT INSUFFLATOR) などが挙げられる。投与経路としては、通常、吸入器具を用いて鼻、口などへ直接吸入するが好ましい。

【0044】このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど)に対して経口的にまたは非経口的に投与することができる。本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性閉塞性肺疾患治療の目的で、上記化合物またはその塩を経口投与する場合、一般的に成人(体重 60kg として)においては、一日につき該化合物またはその塩を約 0.1~100mg、好ましくは約 1.0~50mg、より好ましくは約 1.0~20mg 投与する。非経口的に投与する場合は、上記化合物またはその塩の 1 回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、慢性閉塞性肺疾患治療の目的で、本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩を注射剤の形で通常成人(体重 60kg として)に投与する場合、一日につき該化合物またはその塩を約 0.01~30mg 程度、好ましくは約 0.1~20mg 程度、より好ましくは約 0.1~10mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重 60kg 当たりに換算した量を投与することができる。

【0045】〔2〕本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質に対する抗体(以下、本発明の抗体と略記する場合がある)は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法、および(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質の定量法を提供する。上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質の N 端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質の C 端部に反応する抗体であることが望ましい。また、本発明のタンパク質に対するモノクローナル抗体(以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある)を用いて本発明のタンパク質の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行うこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の F

(a b')₂、F a b'、あるいは F a b 画分を用いてもよい。

【0046】本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、^[125]I)、^[131]I)、^[3]H)、^[14]C)などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。

【0047】サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応

で用いられる抗体が、本発明のタンパク質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原(F)と、抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

【0048】イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。例えば、入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)な

10 などを参照することができる。以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質を感度良く定量することができる。さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質の濃度の増加が検出された場合、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

【0049】〔3〕遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミクス（Genomics）、第5巻、874～879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー（Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America）、第86巻、2766～2770頁（1989年））などにより実施することができる。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合やPCR-SSCP法によりDNAの突然変異が検出された場合は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの疾病である可能性が高いと診断することができる。

【0050】〔4〕アンチセンスポリヌクレオチドを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができる本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは低毒性であり、生体内における本発明のタンパク質または本発明のDNAの機能（例、クロライドチャネル活性）を抑制することができるので、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの予防・治療剤として使用することができる。上記アンチセンスポリヌクレオチドを上記の予防・治療剤として使用する場合、公知の方法に従って製剤化し、投与することができる。例えば、該アンチセンスポリヌクレオチドを用いる場合、該アンチセンスポリヌクレオチドを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。該アンチセンスポリヌクレオチドは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。あるいは、エアロゾル化して吸入剤として気管内に局所投与することもできる。該アンチセンスポリヌクレオチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、慢性閉塞性肺疾患治療の目的で本発明のアンチセンスポリヌクレオチドを吸入剤として気管内に局所投与する場合、一般的に成人（体重60kg）においては、一日につき該アンチセンスポリヌクレオチドを約0.1～100mg投与する。さらに、該アンチセンスポリヌクレオチドは、組織や細胞内における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0051】本発明は、さらに

- ①本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有する二重鎖RNA、
 - ②前記二重鎖RNAを含有してなる医薬、
 - ③本発明のタンパク質をコードするRNAの一部を含有するリボザイム、
 - ④前記リボザイムを含有してなる医薬を提供する。
- これらの二重鎖RNA（RNAi；RNA interference法）、リボザイムなどは、上記アンチセンスポリヌクレオチド

と同様に、本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の発現を抑制することができ、生体内における本発明のペプチドまたは本発明のポリヌクレオチド（例、DNA）の活性や機能（例、クロライドチャネル活性など）を阻害することができるので、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの予防・治療剤として使用することができる。二重鎖RNAは、公知の方法（例、Nature, 411巻, 494頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。リボザイムは、公知の方法（例、TRENDS in Molecular Medicine, 7巻, 221頁, 2001年）に準じて、本発明のポリヌクレオチドの配列を基に設計して製造することができる。例えば、本発明のペプチドをコードするRNAの一部に公知のリボザイムを連結することによって製造することができる。本発明のペプチドをコードするRNAの一部としては、公知のリボザイムによって切断され得る本発明のRNA上の切断部位に近接した部分（RNA断片）が挙げられる。上記の二重鎖RNAまたはリボザイムを上記予防・治療剤として使用する場合、アンチセンスポリヌクレオチドと同様にして製剤化し、投与することができる。

【0052】〔5〕本発明の抗体を含有する医薬
本発明のタンパク質の活性を中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの疾患に対する医薬として使用することができる。本発明の抗体を含有する上記疾患の予防・治療剤は低毒性であり、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の慢性閉塞性肺疾患治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01～20mg/kg体重程度、好ましくは0.1～10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1～5mg/kg体重程度を、1日1～5回程度、好ましくは1日1～3回程度、静脈注射により投与する

のが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記抗体またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート80、HCO-50（polyoxyethylene（50mol）adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

【0053】〔6〕本発明のタンパク質またはDNAを含有する医薬
本発明のタンパク質または本発明のタンパク質をコード

するDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）は、例えば肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの予防・治療剤としても有用である。本発明のタンパク質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。本発明のDNAを上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエートドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。例えば、本発明のタンパク質または本発明のDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質または本発明のDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。本発明のタンパク質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。本発明のDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓

器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0054】〔7〕本発明のDNAを有する動物の作出
本発明は、外来性の本発明のタンパク質をコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、（1）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物、（2）非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記（1）記載の動物、

（3）ゲッ歯動物がマウスまたはラットである上記

（2）記載の動物、および（4）本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを含有し、哺乳動物において発現しうる組換えベクターなどを提供する。本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物

（以下、本発明のDNA導入動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを導入することによって作出することができる。また、該DNA導入方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA導入動物を作出することもできる。非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

【0055】本発明の外来性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。該異常DNAとしては、異常な本発明のタンパク質を発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のタンパク質の機能を抑制するタンパク質を発現させるDNAなどが用いられる。本発明の外來性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に導入させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを導入させる場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA導入哺乳動物を作出することができる。

【0056】本発明のタンパク質の発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、入ファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病ウイルスなどのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが好ましく用いられる。上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、①ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキニンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 β 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存タンパク質キナーゼ β Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロティナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、

ドーパミン β -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）、 β アクチン、 α および β ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎タンパク質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VNP）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 α アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1 α （EF-1 α ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ β アクチンプロモーターなどが好適である。上記ベクターは、DNA導入哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

【0057】その他、目的とする外來性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。正常な本発明のタンパク質の翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外來性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。該翻訳領域はDNA導入動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外來性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを保持することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外來性DNAを有する。本発明の外來性正常DNAを導入させた非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来

る。受精卵細胞段階における本発明の外來性DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外來性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外來性DNAを過剰に有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0058】本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のタンパク質の機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能亢進症や、本発明のタンパク質に関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。また、本発明の外來性正常DNAを導入させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質に関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。一方、本発明の外來性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外來性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外來DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的な手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの導入は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA導入後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外來性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0059】本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のタンパク質の機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症の病態機序の解

明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症における本発明の異常タンパク質による正常タンパク質の機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。また、本発明の外來異常DNAを導入させた哺乳動物は、遊離した本発明のタンパク質の増加症状を有することから、本発明のタンパク質またはその機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。また、上記2種類の本発明のDNA導入動物のその他の利用可能性として、例えば、

- ①組織培養のための細胞源としての使用、
- ②本発明のDNA導入動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析する、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のタンパク質により特異的に発現あるいは活性化するタンパク質との関連性についての解析、
- ③DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- ④上記③記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- ⑤本発明の変異タンパク質を単離精製およびその抗体作製などが考えられる。さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症などを含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の臨床症状を調べることができ、また、本発明のタンパク質に関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

【0060】また、本発明のDNA導入動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどのタンパク質分解酵素により、遊離したDNA導入細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のタンパク質産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のタンパク質およびその作用解明のための有効な研究材料となる。さらに、本発明のDNA導入動物を用いて、本発明のタンパク質の機能不活性型不応症を含む、本発明のタンパク質に関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA導入動物または本発明の外來性DNA発現ベクターを用いて、本発明のタンパク質に関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

【0061】〔8〕ノックアウト動物

本発明は、本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を提供する。すなわち、本発明は、(1)本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞、

(2)該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化された上記(1)記載の胚幹細胞、(3)ネオマイシン耐性である上記(1)記載の胚幹細胞、(4)非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(1)記載の胚幹細胞、(5)ゲッ歯動物がマウスである上記(4)記載の胚幹細胞、(6)本発明のDNAが不活性化された該DNA発現不全非ヒト哺乳動物、(7)該DNAがレポーター遺伝子(例、大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子)を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうる上記(6)記載の非ヒト哺乳動物、

(8)非ヒト哺乳動物がゲッ歯動物である上記(6)記載の非ヒト哺乳動物、(9)ゲッ歯動物がマウスである上記(8)記載の非ヒト哺乳動物、および(10)上記

(7)記載の動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害(好ましくは阻害)する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、あるいは該DNAがコードしている本発明のタンパク質の活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のタンパク質の発現能を有さない(以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある)非ヒト哺乳動物の胚幹細胞(以下、ES細胞と略記する)をいう。非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0062】本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞

(以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する)の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ(β -ガラクトシダーゼ遺伝子)、cat(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子)を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊する

か、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列(例えば、polyA付加シグナルなど)を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖(以下、ターゲッティングベクターと略記する)を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

【0063】また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知なEvansとKauffmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF₁マウス(C57BL/6とDBA/2とのF₁)を用いて樹立したものなども良好に用いる。BDF₁マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約10⁶個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数(約50個)で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

【0064】また、第二次セレクションとしては、例え

ば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（ $1-10000\text{ U/ml}$ ）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約 37°C で培養するなどの方法で培養し、継代時には、例えば、トリプシン/EDTA溶液（通常 $0.001-0.5\%$ トリプシン/ $0.1-5\text{ mM}$ EDTA、好ましくは約 0.1% トリプシン/ 1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1-3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり〔M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年; G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.) 第78巻、7634頁、1981年; T. C. Doetschman ら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年〕、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のタンパク質の細胞生物学的検討において有用である。本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

【0065】本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができ

る。本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはターゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体であり、本発明のタンパク質のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のタンパク質のホモ発現不全個体を得ることができる。卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のタンパク質により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のタンパク質の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これら

の疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

【0066】〔8a〕本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。例えば、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息に対して予防・治療効果を有する化合物をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物にタバコ煙または抗原曝露処置を行ない、タバコ煙または抗原曝露処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の気道反応性変化などを経時的に測定する。該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質の欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して予防・治療効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な予防・治療剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

【0067】該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞

酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の慢性閉塞性肺疾患の患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、該化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の慢性閉塞性肺疾患の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0068】〔8b〕本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

【0069】本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。例えば、本発明のタンパク質をコードするDNA領域の一部を大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）で置換している

場合、本来、本発明のタンパク質の発現する組織で、本発明のタンパク質の代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド(X-gal)のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のタンパク質の動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のタンパク質欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mM EDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、lacZをコードするmRNAを検出してもよい。上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

【0070】該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

【0071】また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のタンパク質の発現を阻害し、該タンパク質の機能を阻害することができるので、例えば肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患[例、慢性閉塞性肺疾患(例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など)、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など]、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎(例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)などの予防・治療剤などの医薬として有用である。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のタンパク質またはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは非ヒト哺乳動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルな

ど)に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)の慢性閉塞性肺疾患の患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)の慢性閉塞性肺疾患の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0072】一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人(体重60kgとして)の慢性閉塞性肺疾患の患者においては、一日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人(60kgとして)の慢性閉塞性肺疾患の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。また、本発明のタンパク質のプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物(遺伝子移入動物)を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のタンパク質そのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

【0073】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB

Commission on Biochemical Nomenclature による略号
あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであ
り、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体

があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すもの
とする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
Y	: シトシン (C) またはチミン (T)
K	: グアニン (G) またはチミン (T)
M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
W	: アデニン (A) またはチミン (T)
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0074】

Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸

Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸

【0075】また、本明細書中で繁用される置換基、保
護基および試薬を下記の記号で表記する。

Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: ブチル基
Ph	: フェニル基
TC	: チアゾリジン-4 (R) -カルボキサミド基
Tos	: p-トルエンスルフォニル
CHO	: ホルミル
Bzl	: ベンジル
Cl ₂ -Bzl	: 2, 6-ジクロロベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
Cl-Z	: 2-クロロベンジルオキシカルボニル
Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc	: t-ブトキシカルボニル

DNP	: ジニトロフェニル
Trt	: トリチル
Bum	: t-ブトキシメチル
Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
HOObt	: 3,4-ジヒドロ-3-ヒドロキシー-4-オキソ- 1,2,3-ベンゾトリアジン
HONB	: 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミ ド
DCC	: N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド

【0076】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕ラットCLCA1タンパク質の部分アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：2〕配列番号：1で表されるアミノ酸配列を有するラットCLCA1タンパク質部分アミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕実施例1で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：4〕実施例1で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕実施例1、および実施例3で用いられたプライマー3の塩基配列を示す。

〔配列番号：6〕実施例1で用いられたプライマー4の塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕実施例1で用いられたプライマー5の塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕実施例1で用いられたプライマー6の塩基配列を示す。

〔配列番号：9〕実施例1で用いられたプライマー7の塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕実施例2で用いられたプライマー8の塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕実施例2で用いられたプライマー9の塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕実施例2で用いられたTaqManプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：13〕実施例3で用いられたプライマー10の塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕実施例3で用いられたプライマー11の塩基配列を示す。

〔配列番号：15〕実施例1および実施例3で用いられたT7プロモータープライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：16〕実施例3で用いられたM13RVプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：17〕実施例3で用いられたプライマー12の塩基配列を示す。

〔配列番号：18〕実施例3で用いられたプライマー13の塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕実施例3で用いられたプライマーA

P1の塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕実施例3で用いられたプライマーAP2の塩基配列を示す。

〔配列番号：21〕実施例1で用いられたプライマーU19プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：22〕ラットCLCA1タンパク質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：23〕配列番号：22で表されるアミノ酸配列を有するラットCLCA1タンパク質をコードするDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：24〕実施例3で用いられたプライマー14の塩基配列を示す。

〔配列番号：25〕実施例3で用いられたプライマー15の塩基配列を示す。

【0077】以下の実施例3で得られた形質転換体Escherichia coli TOP10/pCR-BluntII-rCLCA1は、2002年1月9日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託番号FERM BP-7846として、2001年12月18日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号（郵便番号532-8686）の財団法人・発酵研究所（IFO）に寄託番号IFO 16742として寄託されている。

【0078】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。

実施例1

ラットCLCA1遺伝子のクローニング

ヒトCLCA1遺伝子の塩基配列〔ゲノミックス (Genomics)、54巻、200頁 (1998)〕、マウスgob-5遺伝子の塩基配列〔バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.)、255巻、347頁 (1999)〕およびブタCLCA1遺伝子の塩基配列〔フィジオリジカル ゲノミックス (Physiol. Genomics)、3巻、101頁 (2000)〕の共通配列を参考にして5種のプライマー〔プライマー1（配列番号：3）、プライマー2（配列番号：4）、プライマー3（配列番号：5）、プライマー4

30

40

(1) ラットCLCA1完全長遺伝子のクローニング
実施例1で調製したラット胃粘膜全RNAよりmRNA purification kit (Amersham pharmacia biotech社製)を用いてmRNAを調製した。このmRNA 1 μ gを出発材料としてMarathon cDNA Amplification Kit (Clontech社製)を用いてAdaptor-ligated cDNAを合成した。5'-RACEのために、このcDNAを鋳型としてプライマー10 (配列番号: 13) とプライマーAP1 (配列番号: 19) (Clontech社製)の組み合わせでPCRを行った後、その反応液を鋳型にプライマー11 (配列番号: 14) とプライマーAP2 (配列番号: 20) (Clontech社製)の組み合わせでnested PCRを行い、増幅してきたDNA断片をpCR II-TOPO vector (Invitrogen社製)にクローニングした。T7 プロモータープライマー (配列番号: 15)、M13RV プライマー (配列番号: 16) を用いてサイクルシークエンス反応を行い、蛍光DNAシークエンサー3100 (アプライドバイオシステムズ社製)で得られた反応物の塩基配列を決定した。その結果、ラットCLCA1 N末端アミノ酸配列に相当する塩基配列は含まれていなかったため、さらにプライマー12 (配列番号: 17) を合成し、Adaptor-ligated cDNAを鋳型に、プライマーAP2 (Clontech社製)との組み合わせでPCRを行い、増幅してきたDNA断片の塩基配列を直接、蛍光DNAシークエンサー3100 (アプライドバイオシステムズ社製)で決定した。その結果、ラットCLCA1 N末端アミノ酸配列に対応する塩基配列が判明した。また、3'-RACEのために、Adaptor-ligated cDNAを鋳型としてプライマー3とプライマーAP1 (Clontech社製)の組み合わせでPCRを行った後、その反応液を鋳型にプライマー13 (配列番号: 18) とプライマーAP2 (Clontech社製)の組み合わせでnested PCRを行った。続いて増幅してきたDNA断片の塩基配列を直接、蛍光DNAシークエンサー3100 (アプライドバイオシステムズ社製)で決定した。その結果、ラットCLCA1 C末端アミノ酸配列に相当する塩基配列は含まれていなかったため、さらにプライマー14 (配列番号: 19) を合成し、Adaptor-ligated cDNAを鋳型に、プライマーAP2 (Clontech社製)との組み合わせでPCRを行い、増幅してきたDNA断片の塩基配列を直接、蛍光DNAシークエンサー3100 (アプライドバイオシステムズ社製)で決定した。その結果、ラットCLCA1 C末端アミノ酸配列に対応する塩基配列が判明した。

ムズ社製)で決定した。その結果、ラットCLCA1のC末端アミノ酸配列に対応する塩基配列が判明した。以上の結果、ラットCLCA1完全長遺伝子は2730個の塩基配列を有していることが判明した(配列番号:23)。配列番号:23で表される塩基配列がコードする910個のアミノ酸配列を、配列番号:22に示す。配列番号:22で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質を、ラットCLCA1タンパク質と命名した。ラットCLCA1タンパク質は、アミノ酸レベルでヒトCLCA1と76%、マウスgob-5と89%の相同性をそれぞれ示した。配列番号:22で表されるアミノ酸配列の第268番目から第889番目は、配列番号:1で表されるアミノ酸配列の第4番目から第625番目のアミノ酸配列と同一であった。配列番号:1で表されるアミノ酸配列の第1番目から第3番目のTyr-Gly-Leuは、配列番号:22で表されるアミノ酸配列の第265番目から第267番目ではAsn-Gln-Argに置換されている。配列番号:2で表される塩基配列の第1番目から第10番目の配列は、対応する配列番号:23の塩基配列ではAAACCAACGに置換されている。また、第17番目のT、第224番目のC、第1787番目のAおよび第1868番目のCは、対応する配列番号:23の塩基配列では、それぞれC、T、CおよびGに置換されている。

【0081】(2)これらの結果をもとに、ラット胃粘膜cDNAを鋳型としてプライマー14(配列番号:24)とプライマー15(配列番号:25)の組み合わせでPyrobest DNA Polymerase(宝酒造社製)を用いてPCRを行い、配列番号:23で表される塩基配列を有するDNA断片をpCR-BluntII-TOPO vector(Invitrogen社製)にクローニングした。このプラスミドを大腸菌TOP10(Invitrogen社製)に導入し、Escherichia coli TOP10/pCR-BluntII-rCLCA1と命名した。

【0082】実施例4

CLCA1の発現を抑制する化合物のスクリーニング
ラット気道上皮細胞株(SPOC-1)(American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 14巻, 146頁, 1996年)を96穴コラーゲンプレート(ベクトン・ディキンソン社製)に 1×10^4 cells/wellで播種し4日間培養した。培養4日目に、リコンビナントマウスIL-13(R&D社製)および、各種濃度(1、10および100 μ M)のワートマンニン(Wortmannin)(CALBIOCHEM社製)を添加し、さらに24時間培養した。なお、ワートマンニンを添加していない細胞をコントロールとした。細胞をPBSで洗浄し、50 μ l/wellのLysis Buffer(QuantiGene High Volume Kit, Bayer社製)を加え、37℃で30分間静置し細胞を溶解した。各穴に100 μ lのProbe Reagent(QuantiGene High Volume Kit, Bayer社製)を加えてピペティングにより攪拌した後、100 μ lをサンプリングして

yer社製)に添加し、53℃で16~24時間反応させた。Wash Buffer(QuantiGene High Volume Kit, Bayer社製)でプレートを2回洗浄後、100 μ lのAmplifier Working Reagent(QuantiGene High Volume Kit, Bayer社製)を加え、46℃で2時間反応させた。さらに、Wash Bufferでプレートを2回洗浄後、Label Working Reagent(QuantiGene High Volume Kit, Bayer社製)を100 μ l/well添加し、46℃で2時間反応させた。プレートを室温に戻しWash Bufferでプレートを2回洗浄後、Substrate Working Reagent(QuantiGene High Volume Kit, Bayer社製)を100 μ l/well添加し、46℃で1時間反応させた。プレートを室温に戻した後、プレートリーダーで発光強度を測定した。ラットCLCA1の発現量に比例して発光強度が増加するので、発光強度を測定することによりラットCLCA1のmRNAを定量することができる。ワートマンニンを添加していないコントロール細胞では、IL-13によりラットCLCA1が発現誘導され発光強度が増加する。結果を図2に示す。これより、ワートマンニンは濃度依存的にラットCLCA1の発現を抑制することがわかる。よって、上記スクリーニングを用いて、CLCA1の発現を抑制する化合物を選択することができる。

【0083】

【発明の効果】本発明のタンパク質およびポリヌクレオチドは、例えば肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患(例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など)、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など)、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎(例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)などの診断マーカー等として有用であり、該タンパク質またはポリヌクレオチドを用いるスクリーニングにより得られる阻害剤、該タンパク質の活性を阻害する中和抗体は、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患(例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など)、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など)、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎(例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)などの予防・治療剤として使用することができる。また、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質の発現を抑制することができ、例えば、肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患(例、慢性閉塞性肺疾患(例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など)、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など)、炎症性腸疾患、アレルギー性結膜炎、鼻炎(例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾

燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など)などの疾病の予防・治療剤として使用することができる。さらに、本発明の各種のポリヌクレオチドは肺・気道の炎症を伴う肺・胸部疾患や呼吸器疾患〔例、慢性閉塞性肺疾患（例、慢性気管支炎、肺気腫、びまん性汎細気管支炎、内因性喘息など）、気管支喘息、嚢胞性線維症、過敏性肺炎、肺線維症など〕、炎症性腸疾患、ア

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> New Protein, DNA and Use thereof

<130> P02-0139

<150> JP 2001-337864

<151> 2001-11-02

<150> JP 2001-380099

<151> 2001-12-13

<150> JP 2002-10035

<151> 2002-01-18

<160> 25

<210> 1

<211> 625

<212> PRT

<213> Rat

<400> 1

```

Tyr Gly Leu Cys Asn Leu Arg Ser Thr Trp Glu Val Ile Gln Glu Ser
      5              10              15
Glu Asp Phe Lys Gln Thr Thr Pro Met Thr Ala Gln Pro Pro Ala Pro
      20              25              30
Thr Phe Ser Leu Leu Gln Thr Arg Gln Arg Ile Val Cys Leu Val Leu
      35              40              45
Asp Lys Ser Gly Ser Met Gln Ser Asp Asn Arg Leu Asn Arg Met Asn
      50              55              60
Gln Ala Ser Arg Leu Phe Leu Leu Gln Thr Val Glu Gln Gly Ser Trp
      65              70              75              80
Val Gly Met Val Thr Phe Asp Ser Thr Ala Tyr Val Gln Ser Glu Leu
      85              90              95
Thr Gln Leu Asn Ser Gly Ala Asp Arg Asp Leu Leu Ile Lys Arg Leu
      100             105             110
Pro Thr Val Ala Ser Gly Gly Thr Ser Ile Cys Ser Gly Leu Gln Ala
      115             120             125
Ala Phe Thr Ser Ile Lys Lys Lys Tyr Pro Thr Asp Gly Ala Glu Ile
      130             135             140
Val Leu Leu Thr Asp Gly Glu Asp Asn Thr Ile Ser Ser Cys Phe Asp
      145             150             155             160
Leu Val Lys Asn Ser Gly Ala Ile Ile His Thr Val Ala Leu Gly Pro
      165             170             175
Ser Ala Ala Lys Glu Leu Glu Gln Leu Ser Lys Met Thr Gly Gly Leu
      180             185             190
Gln Thr Tyr Ser Ser Asp Gln Ile Gln Asn Asn Gly Leu Val Asp Ala
      195             200             205
Phe Ala Ala Leu Ser Ser Gly Asn Ala Ala Ile Ser Gln His Ser Ile

```

レルギー性結膜炎、鼻炎（例、アレルギー性鼻炎、花粉症、急性鼻炎、慢性鼻炎、肥厚性鼻炎、萎縮性鼻炎、乾燥性前鼻炎、血管運動性鼻炎、壊疽性鼻炎、副鼻腔炎など）などの診断、予防または治療に有用である。

【0084】

【配列表】

63

64

210	215	220
Gln Leu Glu Ser Arg Gly Val Asn Leu Gln Asn Lys Gln Trp Met Asn		
225	230	235
Gly Ser Val Ile Val Asp Ser Thr Val Gly Lys Asp Thr Leu Phe Leu		240
	245	250
Val Thr Trp Thr Thr Asn Ser Pro Ser Ile Phe Ile Trp Asp Pro Ser		255
	260	265
Gly Val Gln Gln Ser Gly Phe Val Leu Asp Thr Asn Thr Lys Val Ala		270
	275	280
Tyr Leu Gln Val Pro Gly Ile Ala Lys Val Gly Phe Trp Lys Tyr Ser		285
	290	295
Ile Gln Ala Ser Ser Gln Thr Leu Thr Leu Thr Val Thr Ser Arg Ala		300
305	310	315
Ala Ser Ala Thr Leu Pro Pro Ile Thr Val Thr Pro Val Val Asn Lys		320
	325	330
Asn Thr Gly Lys Phe Pro Ser Pro Val Thr Val Tyr Ala Ser Ile Arg		335
	340	345
Gln Gly Ala Ser Pro Ile Leu Arg Ala Ser Val Thr Ala Leu Ile Glu		350
	355	360
Ser Val Asn Gly Lys Thr Val Thr Leu Glu Leu Leu Asp Asn Gly Ala		365
	370	375
Gly Ala Asp Ala Thr Lys Asn Asp Gly Val Tyr Ser Arg Phe Phe Thr		380
385	390	395
Ala Phe Asp Ala Asn Gly Arg Tyr Ser Ile Lys Ile Trp Ala Leu Gly		400
	405	410
Gly Val Thr Ala Asp Arg Gln Arg Met Ala Pro Gln Arg Asn Gly Val		415
	420	425
Met Tyr Ile Asp Gly Trp Ile Glu Asp Asp Gly Glu Ile Lys Met Asn		430
	435	440
Pro Pro His Pro Glu Thr Gly Asn Val Gln Asp Ser Gln Val Cys Phe		445
	450	455
Ser Arg Thr Ser Ser Gly Gly Ser Phe Val Ala Thr Asn Val Pro Ala		460
465	470	475
Ala Pro Ile Pro Asp Leu Phe Pro Pro Cys Gln Ile Thr Asp Leu Lys		480
	485	490
Ala Ser Ile Gln Gly Gln Asn Leu Val Asn Leu Thr Trp Thr Ala Pro		495
	500	505
Gly Asp Asp Tyr Asp His Gly Arg Ala Ser Ser Tyr Ile Ile Arg Ile		510
	515	520
Ser Thr Ser Ile Val Asp Leu Arg Asn Asn Phe Ser Thr Ser Leu Glu		525
	530	535
Val Asn Thr Thr Asp Leu Ile Pro Lys Glu Ala Ser Ser Glu Glu Met		540
545	550	555
Phe Glu Phe Glu Leu Asp Asn Ser Phe Gly Asn Gly Thr Asp Val Phe		560
	565	570
Ile Ala Ile Gln Ala Val Asp Lys Ser Asn Leu Lys Ser Glu Ile Ser		575
	580	585
Asn Ile Ala Arg Val Ser Leu Phe Ile Pro Ala Gln Glu Pro Pro Glu		590
	595	600
Asp Ser Thr Pro Ser Tyr Pro Glu Val Ser Ile Asn Ser Thr Ile Pro		605

65

66

610

615

620

Gly

625

<210> 2

<211> 1879

<212> DNA

<213> Rat

<400> 2

catatggggtt atgcaatctc cgaagcactt gggaagtcac ccaggaatct gaggacttca 60
agcaaaccac tcccatgaca gccagccac ccgacccac cttctactg ctgcaaacca 120
gacaaagaat cgtgtgcctc gttcttgata agtccgggag catgcagagc gataaccgtc 180
ttaaccgaat gaatcaggca agccggcttt tcctgctgca gaccgtggag cagggatcct 240
gggtcgggat ggtgacctc gacagtaccg cctatgtaca aagcgaactc acacagttaa 300
acagtgggtc tgacagagac ctgctgatca agcgcttacc cacagtagct tcaggaggga 360
cgtctatatg ctctgggctt caggcagcat ttacatcgat aaagaagaag taccgacgg 420
atggagctga aatcgtgctg ctgaccgacg gggaagataa caccattagc agctgctttg 480
acctgggtga gaacagtggg gccatcattc acacagtggc cctgggaccg tctgccgcta 540
aagagcttga acagctgtcc aaaatgacag gaggttgca aacgtattct tccgatcaga 600
ttcagaacaa cggcttctgt gatgctttcg cagctctctc ctcaggaaat gcagctatct 660
ctcagcactc catccagctg gagagcagag gagttaatct ccagaataag cagtggatga 720
atggctcagt gatcgtggac agcacagtgg ggaaggacac cttgtttctt gtcacctgga 780
ctacgaattc tccttcaata tttatctggg atcccagtg agtgcaacaa agtggttttg 840
tactagacac caacaccaag gtggcctacc tccaagtccc aggcatagcc aaggttggct 900
tttggaataa cagcattcaa gcgagctcac agactctcac tttgactgtc acctcccggg 960
cagcaagcgc tacactgcct ccaattacag tgacccagc agtgaataag aacacaggga 1020
aattccccag ccctgtaacc gtgtatgcaa gcattcgcca aggagcctcg cctattctca 1080
gggccagtgt cacagccctg attgaatctg tgaatggaaa aacagtaacc ctggaattac 1140
tggtatacgg agcaggtgcc gatgctacca agaatgatgg tgtctactca aggtttttta 1200
cagcttttga tgcaaatggt agatacagca tcaaaatatg ggctctggga ggagtactg 1260
cagacagaca gagaatggcc cctcagagga atggagtcac gtacatagat ggctggattg 1320
aagacgacgg tgaaataaaa atgaatccac cacaccctga aactggtaat gttcaagaca 1380
gccaaagtgt cttcagcagg acatcctcag ggggacgtt tgtggccacc aacgtccccg 1440
cagctcccat tcctgacctc tttccacctt gccaaatcac tgacctgaag gctagcattc 1500
aagggcagaa ccttgatgaat ctgacgtgga cggctcctgg ggatgattac gaccacggga 1560
gagcttcag ttacatcatc cgaataagca cgagtatcgt cgatctcaga aacaacttca 1620
gcacctcact cgaagtgaac actaccgatc tcatcccaa ggaggccagc tccgaggaaa 1680
tggttgagtt tgaactggac aacagctttg gaaatggcac agatgtcttc attgctatcc 1740
aggctgtgga taagtccaac ctgaaatcag aaatctccaa cattgcacgg gtgtctctgt 1800
tcacccccgc tcaggagccg ccagaagact caactccttc ttatcccgaa gtcagcatca 1860
acagcaccat tcctggcat 1879

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

atgcaatctc cgaagcac

18

<210> 4

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 4
 atgccaggaa tgggtgctgtt ga 22
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 5
 tggacrgctc ctggggatga 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 6
 tcatccccag gagcygtcca 20
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 7
 gtgcaatggtt ggakatttct ga 22
 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 8
 tggccttcgg acagcattta ca 22
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 9
 cctgagaata ggcgaggctc cttggcg 27
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 10
 tcaagcgagc tcacagactc tc 22
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 11
 aattggaggc agtgtagcgc 20
 <210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Probe
 <400> 12
 ttgactgtc acctcccggg cag 23
 <210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 13
 tgtcatggga gtggtttgct tg 22
 <210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 14
 gtgcttcgga gattgcat 18
 <210> 15
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 15
 aatacgactc actataggg 19
 <210> 16
 <211> 17
 <212> DNA

71

72

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 16
 caggaaacag ctatgac 17
 <210> 17
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 17
 cgttggatga gggcttcac ttctggc 27
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 18
 aggctgtgga taagtccaac 20
 <210> 19
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 19
 ccacctaata acgactcact atagggc 27
 <210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 20
 actcactata gggctcgagc ggc 23
 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Primer
 <400> 21
 gttttcccag tcacgacgt 19
 <210> 22
 <211> 910
 <212> PRT

73

74

<213> Rat

<400> 22

Met Gly Ser Leu Lys Ser Pro Val Phe Leu Leu Val Leu Tyr Leu Leu
 5 10 15
 Glu Gly Val Leu Ser Asn Ser Leu Ile Gln Leu Asn Asn Asn Gly Tyr
 20 25 30
 Glu Gly Ile Val Ile Ala Ile Asp His Asp Val Pro Glu Asp Glu Ala
 35 40 45
 Leu Ile Gln Arg Ile Lys Asp Met Val Thr Gln Ala Ser Pro Tyr Leu
 50 55 60
 Phe Glu Ala Thr Gly Lys Arg Phe Tyr Phe Lys Asn Val Ala Ile Leu
 65 70 75 80
 Ile Pro Glu Asn Trp Asn Thr Lys Pro Glu Tyr Lys Arg Pro Lys Leu
 85 90 95
 Glu Thr Leu Lys Asn Ala Asp Val Leu Val Ser Thr Met Ser Pro Ile
 100 105 110
 Gly Asn Asp Glu Pro Tyr Thr Glu His Ile Gly Ala Cys Gly Glu Arg
 115 120 125
 Gly Ile Arg Ile His Leu Thr Pro Asp Phe Leu Ala Gly Lys Lys Gln
 130 135 140
 Thr Glu Tyr Gly Pro Gln Asp Arg Thr Phe Val His Glu Trp Ala His
 145 150 155 160
 Phe Arg Trp Gly Val Phe Asp Glu Tyr Asn Asn Asn Glu Lys Phe Tyr
 165 170 175
 Leu Ser Asn Gly Lys Pro Gln Ala Val Arg Cys Ser Ala Thr Ile Thr
 180 185 190
 Gly Lys His Val Val Arg Arg Cys Gln Gly Gly Ser Cys Val Thr Asn
 195 200 205
 Gly Lys Cys Val Ile Asp Arg Val Thr Gly Leu Tyr Lys Asp Asn Cys
 210 215 220
 Val Phe Ile Pro Asp Lys Asn Gln Arg Glu Lys Ala Ser Ile Met Phe
 225 230 235 240
 Asn Gln Asn Ile Asn Ser Val Val Glu Phe Cys Thr Glu Lys Asn His
 245 250 255
 Asn Lys Glu Ala Pro Asn Ala Gln Asn Gln Arg Cys Asn Leu Arg Ser
 260 265 270
 Thr Trp Glu Val Ile Gln Glu Ser Glu Asp Phe Lys Gln Thr Thr Pro
 275 280 285
 Met Thr Ala Gln Pro Pro Ala Pro Thr Phe Ser Leu Leu Gln Thr Arg
 290 295 300
 Gln Arg Ile Val Cys Leu Val Leu Asp Lys Ser Gly Ser Met Gln Ser
 305 310 315 320
 Asp Asn Arg Leu Asn Arg Met Asn Gln Ala Ser Arg Leu Phe Leu Leu
 325 330 335
 Gln Thr Val Glu Gln Gly Ser Trp Val Gly Met Val Thr Phe Asp Ser
 340 345 350
 Thr Ala Tyr Val Gln Ser Glu Leu Thr Gln Leu Asn Ser Gly Ala Asp
 355 360 365
 Arg Asp Leu Leu Ile Lys Arg Leu Pro Thr Val Ala Ser Gly Gly Thr
 370 375 380

Ser Ile Cys Ser Gly Leu Gln Ala Ala Phe Thr Ser Ile Lys Lys Lys
 385 390 395 400
 Tyr Pro Thr Asp Gly Ala Glu Ile Val Leu Leu Thr Asp Gly Glu Asp
 405 410 415
 Asn Thr Ile Ser Ser Cys Phe Asp Leu Val Lys Asn Ser Gly Ala Ile
 420 425 430
 Ile His Thr Val Ala Leu Gly Pro Ser Ala Ala Lys Glu Leu Glu Gln
 435 440 445
 Leu Ser Lys Met Thr Gly Gly Leu Gln Thr Tyr Ser Ser Asp Gln Ile
 450 455 460
 Gln Asn Asn Gly Leu Val Asp Ala Phe Ala Ala Leu Ser Ser Gly Asn
 465 470 475 480
 Ala Ala Ile Ser Gln His Ser Ile Gln Leu Glu Ser Arg Gly Val Asn
 485 490 495
 Leu Gln Asn Lys Gln Trp Met Asn Gly Ser Val Ile Val Asp Ser Thr
 500 505 510
 Val Gly Lys Asp Thr Leu Phe Leu Val Thr Trp Thr Thr Asn Ser Pro
 515 520 525
 Ser Ile Phe Ile Trp Asp Pro Ser Gly Val Gln Gln Ser Gly Phe Val
 530 535 540
 Leu Asp Thr Asn Thr Lys Val Ala Tyr Leu Gln Val Pro Gly Ile Ala
 545 550 555 560
 Lys Val Gly Phe Trp Lys Tyr Ser Ile Gln Ala Ser Ser Gln Thr Leu
 565 570 575
 Thr Leu Thr Val Thr Ser Arg Ala Ala Ser Ala Thr Leu Pro Pro Ile
 580 585 590
 Thr Val Thr Pro Val Val Asn Lys Asn Thr Gly Lys Phe Pro Ser Pro
 595 600 605
 Val Thr Val Tyr Ala Ser Ile Arg Gln Gly Ala Ser Pro Ile Leu Arg
 610 615 620
 Ala Ser Val Thr Ala Leu Ile Glu Ser Val Asn Gly Lys Thr Val Thr
 625 630 635 640
 Leu Glu Leu Leu Asp Asn Gly Ala Gly Ala Asp Ala Thr Lys Asn Asp
 645 650 655
 Gly Val Tyr Ser Arg Phe Phe Thr Ala Phe Asp Ala Asn Gly Arg Tyr
 660 665 670
 Ser Ile Lys Ile Trp Ala Leu Gly Gly Val Thr Ala Asp Arg Gln Arg
 675 680 685
 Met Ala Pro Gln Arg Asn Gly Val Met Tyr Ile Asp Gly Trp Ile Glu
 690 695 700
 Asp Asp Gly Glu Ile Lys Met Asn Pro Pro His Pro Glu Thr Gly Asn
 705 710 715 720
 Val Gln Asp Ser Gln Val Cys Phe Ser Arg Thr Ser Ser Gly Gly Ser
 725 730 735
 Phe Val Ala Thr Asn Val Pro Ala Ala Pro Ile Pro Asp Leu Phe Pro
 740 745 750
 Pro Cys Gln Ile Thr Asp Leu Lys Ala Ser Ile Gln Gly Gln Asn Leu
 755 760 765
 Val Asn Leu Thr Trp Thr Ala Pro Gly Asp Asp Tyr Asp His Gly Arg
 770 775 780

77

78

Ala Ser Ser Tyr Ile Ile Arg Ile Ser Thr Ser Ile Val Asp Leu Arg
 785 790 795 800
 Asn Asn Phe Ser Thr Ser Leu Glu Val Asn Thr Thr Asp Leu Ile Pro
 805 810 815
 Lys Glu Ala Ser Ser Glu Glu Met Phe Glu Phe Glu Leu Asp Asn Ser
 820 825 830
 Phe Gly Asn Gly Thr Asp Val Phe Ile Ala Ile Gln Ala Val Asp Lys
 835 840 845
 Ser Asn Leu Lys Ser Glu Ile Ser Asn Ile Ala Arg Val Ser Leu Phe
 850 855 860
 Ile Pro Ala Gln Glu Pro Pro Glu Asp Ser Thr Pro Ser Tyr Pro Glu
 865 870 875 880
 Val Ser Ile Asn Ser Thr Ile Pro Gly Ile His Val Leu Asn Ile Val
 885 890 895
 Trp Lys Trp Leu Gly Glu Met His Val Thr Leu Gly Leu His
 900 905 910

<210> 23

<211> 2730

<212> DNA

<213> Rat

<400> 23

atgggatctt tgaagagtcc tgtcttcctc ttggtcctct accttctgga aggggttctg 60
 agcaattccc tcatccagtt gaacaacaat ggctatgaag gcatcgtcat tgccatagac 120
 cacgatgtgc cagaagatga agccctcatc caacggataa aggacatggt gactcaggcc 180
 tctccatacc tgtttgaagc tacagggaaa agattttact tcaaaaatgt tgccattttg 240
 attcctgaga attggaacac aaaacctgaa tataagaggc caaaacttga aaccttaaaa 300
 aatgctgatg tccttgtgtc aacaatgagc cccataggta atgatgagcc ctacaccgag 360
 cacataggag catgtggaga aagggggatc aggattcacc tgactcctga cttcttagca 420
 ggaaagaagc agactgagta tggccacaa gacaggacgt ttgttcata gtagggctcac 480
 ttccgatggg gggtgtttga cgagtacaac aacaacgaga agttctactt gtccaacgga 540
 aagccccagg cagtaagatg ttcggcaacc attaccggta aacatgtagt tcgtcggtagc 600
 cagggaggga gttgcgtcac taacggaaag tgcgtaatcg acagagtaac gggactgtat 660
 aaagataact gtgtattcat accagataaa aaccagagag agaaggcgtc catcatgttt 720
 aacaaaata tcaactctgt ggttgaattc tgtacagaaa aaaatcacaa taaagaagcc 780
 cccaatgccc aaaaccaacg atgcaacctc cgaagcactt gggaagtcac ccaggaaatc 840
 gaggacttca agcaaaccac tccatgaca gccagccac ccgacccac cttctcactg 900
 ctgcaaacca gacaaagaat cgtgtgcctc gttcttgata agtccgggag catgcagagc 960
 gataaccgtc ttaaccgaat gaatcaggca agccggcctt tcctgctgca gactgtggag 1020
 cagggatcct gggtcgggat ggtgacctc gacagtaccg cctatgtaca aagcgaactc 1080
 acacagttaa acagtggtagc tgacagagac ctgctgatca agcgttacc cacagtagct 1140
 tcaggaggga cgtctatatg ctctgggctt caggcagcat ttacatcgat aaagaagaag 1200
 taccgacagg atggagctga aatcgtgctg ctgaccgacg gggaagataa caccattagc 1260
 agctgctttg acctgggtga gaacagtggg gccatcattc acacagtggc cctgggaccg 1320
 tctgccgcta aagagcttga acagctgtcc aaaatgacag gaggcttgca aacgtattct 1380
 tccgatcaga ttcagaacaa cggtcttggt gatgctttcg cagctctctc ctcaggaaat 1440
 gcagctatct ctcagcactc catccagctg gagagcagag gagttaatct ccagaataag 1500
 cagtggatga atggctcagt gatcgtggac agcacagtgg ggaaggacac cttgtttctt 1560
 gtcacctgga ctacgaattc tccttcaata tttatctggg atcccagtgg agtgaacaa 1620
 agtggttttg tactagacac caacaccaag gtggcctacc tccaagtcac aggcatagcc 1680
 aaggttggct tttggaata cagcattcaa gcgagctcac agactctcac tttgactgtc 1740

acctccccggg cagcaagcgc tacactgcct ccaattacag tgaccccagt agtgaataag 1800
 aacacaggga aattccccag ccctgtaacc gtgtatgcaa gcattcgcca aggagcctcg 1860
 cctattctca gggccagtgt cacagccctg attgaatctg tgaatggaaa aacagtaacc 1920
 ctggaattac tggataacgg agcagggtgcc gatgctacca agaattgatgg tgtctactca 1980
 aggtttttta cagcttttga tgcaaatggt agatacagca tcaaaatatg ggctctggga 2040
 ggagtactg cagacagaca gagaatggcc cctcagagga atggagtcac gtacatagat 2100
 ggctggattg aagacgacgg tgaataaaaa atgaatccac cacaccctga aactggtaat 2160
 gttcaagaca gccaaagtgtg cttcagcagg acatcctcag ggggatcggt tgtggccacc 2220
 aacgtccccg cagctcccat tcctgacctc tttccacctt gccaaatcac tgacctgaag 2280
 gctagcattc aagggcagaa ccttgtgaat ctgacgtgga cggctcctgg ggatgattac 2340
 gaccacggga gagcttccag ttacatcatc cgaataagca cgagtatcgt cgatctcaga 2400
 aacaacttca gcacctcact cgaagtgaac actaccgatc tcatccccaa ggaggccagc 2460
 tccgaggaaa tgtttgagtt tgaactggac aacagctttg gaaatggcac agatgtcttc 2520
 attgtatcc aggtgtgga taagtccaac ctgaaatcag aaatctcaa cattgcccg 2580
 gtgtctctgt tcatccccgc tcaggagccg ccagaagact caactccttc ttatcccga 2640
 gtcagcatca acagcacgat tcctggcatc cacgtgctga atatagtgtg gaagtggcta 2700
 ggggaaatgc atgtgacact aggtttgcac 2730

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 24

gggaaagctg aagatgggat ctttg 25

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 25

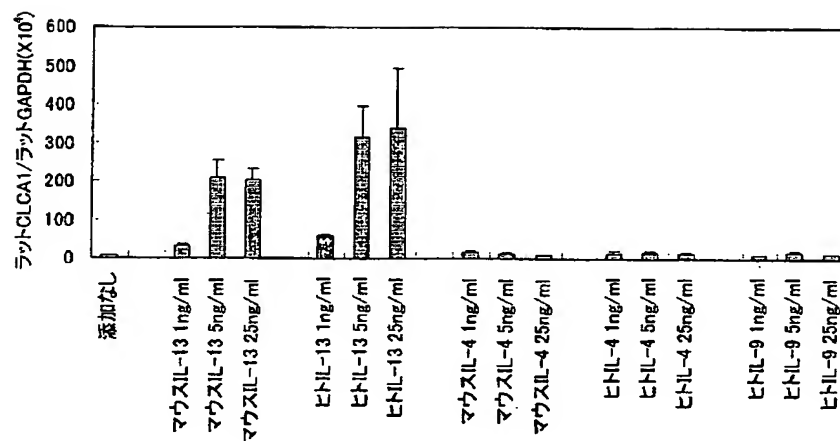
ttttacagct tcacgtgtta ctacatc 27

【図面の簡単な説明】

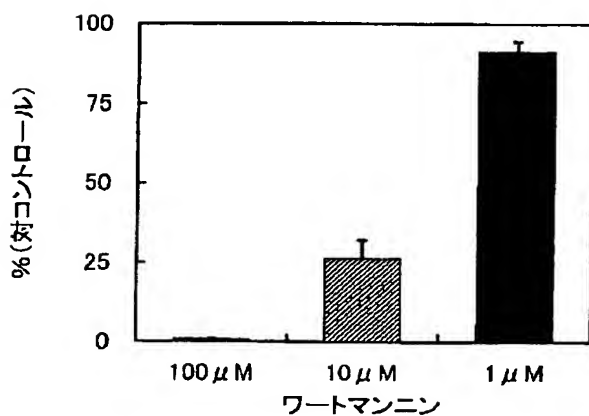
【図 1】 実施例 2 の、マウス IL-13、ヒト IL-13、マウス IL-4、ヒト IL-4 またはヒト IL-9 存在下での、ラット初代気道上皮細胞におけるラット CLCA1 遺伝子の発現誘導を示す。図中、縦軸は、GAPDH 遺伝子あたりのラット CLCA1 遺伝子コピー数を示す。

【図 2】 実施例 4 における、SPOC-1 細胞での IL-13 によるラット CLCA1 遺伝子の発現誘導に対するワートマンニンの抑制作用を表す図である。図中、縦軸はコントロールの発光強度を 100% としたときのワートマンニン添加時の発光強度を示す。白いバーはワートマンニン濃度 100 μ M、灰色のバーはワートマンニン濃度 10 μ M、黒いバーはワートマンニン濃度 1 μ M を添加した場合のラット CLCA1 遺伝子の発現量である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

識別記号

F I

テマコード (参考)

C 0 7 K 16/18

C 1 2 N 1/15

4 C 0 8 4

C 1 2 N 1/15

1/19

4 H 0 4 5

1/19

1/21

1/21

C 1 2 P 21/02

C

5/10

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 P 21/02

1/68

A

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/15

Z

1/68

33/50

Z

G 0 1 N 33/15

C 1 2 N 15/00

Z N A A

33/50

5/00

A

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB14 CB01 CB17
DA13 DA36 FB02 FB03 FB05
FB13 GC15
4B024 AA01 AA11 BA61 CA04 DA06
HA08 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ53 QQ61
QR32 QR42 QR50 QR55 QR72
QR77 QS34
4B064 AG01 AG26 CA02 CA05 CA10
CA11 CA19 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA91Y
AB01 AB02 BA01 BA08 CA24
CA44 CA46
4C084 AA17 ZA592 ZA602
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA09
CA40 DA75 EA20 EA50 FA74